

НОВЫЙ ТИП ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ КЕРАТОПРОТЕЗА НА ОСНОВЕ АЛЛОГЕННОЙ МОДИФИЦИРОВАННОЙ ДОНОРСКОЙ РОГОВИЦЫ И КУЛЬТИВИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

Борзенко С.А.¹, Васильев А.В.², Шипунова А.В.¹, Дашиинимаев Э.Б.², Мороз З.И.¹, Комах Ю.А.¹, Ковшун Е.В.¹

¹ ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Росмедтехнологий

² Учреждение Российской академии наук «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова»

При осложненных бельмах единственным эффективным способом восстановления зрения является кератопротезирование. Все чаще для замещения и восстановления поврежденных тканей организма используются биоинженерные конструкции, содержащие постнатальные фибробласты кожи человека. В связи с актуальностью данной проблемы была определена цель – разработать и обосновать преимущества технологии изготовления биоинженерной конструкции кератопротезного комплекса с использованием модифицированной донорской роговицы и культивированных фибробластов для лечения осложненных и истонченных бельм. На доклиническом этапе методами культуральных, морфологических, цитохимических исследований показана биоинженерная состоятельность предложенной конструкции биокератопротезного комплекса.

Ключевые слова: тканеинженерная конструкция, кератопротезирование, постнатальные фибробласты кожи, кросслинкинг роговичного коллагена.

NEW BIOKERATOPROSTHETIC COMPLEX BASED ON MODIFIED ALLOGENIC DONOR CORNEAS AND CULTURED POSTNATAL HUMAN SKIN FIBROBLASTS

Borzenok S.A.¹, Vasilyev A.V.², Shipunova A.V.¹, Dashinimaev E.B.², Moroz Z.I.¹, Komakh Y.A.¹, Kovshun E.V.¹

¹ SN Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution

² NK Koltsov Institute of Developmental Biology

The aim of the study was to develop biokeratoprosthetic complex based on cross-linking modified allogenic donor corneas and cultured postnatal human skin fibroblasts. Cross-linking enhances corneal strength and tolerance to proteolytic enzymes. Fibroblasts' proliferation and migration in the intrastromal pocket stimulates fiber syncytium formation and collagen microcarriers integration into the corneal stroma, as well as intercellular matrix formation around the prosthetic metallic plate as early as the cocultivation stage. A new biokeratoprosthetic complex has been successfully developed for further in vivo studies.

Key words: tissue engineering construct, keratoprosthetics, postnatal skin fibroblasts, corneal collagen crosslinking.

Статья поступила в редакцию 15.06.11 г.

Контакты: Шипунова Анна Владимировна, аспирант лаборатории трансплантологии и клеточных технологий с Глазным тканевым банком ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Росмедтехнологий.

Тел. 8 (926) 524-28-80, **e-mail:** shipunova84@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ

Протезирование роговицы является единственным эффективным методом восстановления зрения пациентам с осложненными и истонченными бельмами [2–4, 7, 10, 14, 15, 18]. На сегодня существенной проблемой остается сохранение имплантированного кератопротеза в тканях бельма вследствие развития различного рода осложнений, наиболее значимым из которых является асептический некроз (рис. 1) [3, 4, 7, 10, 15, 18].

К некрозу могут приводить повышенное внутриглазное давление, длительно существующая ретропротезная мембрана, поверхностное расслоение бельма и несовпадение радиусов кривизны бельма и опорной пластины, постоянное давление опорной пластины протеза на патологически измененные ткани бельма, повышенное испарение с поверхности роговицы [2, 14, 15, 18]. Существует мнение, что причинами асептического некроза могут быть трофические нарушения, возникающие после введения опорной пластинки с избыточной механической жесткостью конструкции и малой площадью перфораций в толщу бельма [4, 7, 10].

Поиск способов повышения биомеханической прочности роговицы способствовал разработке новых методов «сшивания» коллагена. Наиболее эффективная и безопасная техника основана на эффекте фотополимеризации стромальных волокон под воздействием фоточувствительной субстанции – раствора рибофлавина, и низких доз ультрафиолетового излучения твердотельного UVA-источника [17, 20]. В результате происходит утолщение коллагеновых волокон, повышение ригидности роговицы и ее устойчивости к действию протеолитических ферментов.

Распространенным подходом в инжиниринге тканей является создание биоинженерных конструкций, содержащих прогениторные клетки че-

ловека в комбинации с полимерными матрицами, интегрирующимися в организм реципиента [1, 6, 8, 9, 11–13, 16, 19]. По нашему мнению, проблема инжиниринга биокератопротезного комплекса и искусственной роговицы [4] может рассматриваться как перспективное направление в клеточной биологии, регенеративной медицине и трансплантологии. Целью данной работы явилась разработка и обоснование преимуществ технологии изготовления конструкции биокератопротезного комплекса на основе кросслинking-модифицированной аллогенной донорской роговицы и культивированных фибробластов кожи для повышения качества трансплантата при использовании его в лечении тяжелых осложненных бельм.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Метод кросслинкинга роговичного коллагена

В эксперименте *in vitro* использовалось 24 кадаверные роговицы человека, не востребованные для трансплантации. Для имплантации титановой опорной пластинки кератопротеза (ОПК) модели Федорова–Зуева в строме данных роговиц был сформирован карман 6×8 мм, соответствующий размерам пластинки. Часть роговиц ($n = 12$) помещали на 14 суток в среду DMEM («Биолот», Россия), содержащую 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (HyClone, США). Затем для сканирующего электронного исследования роговицы фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина. Остальные роговицы помещали на 1 час в раствор, содержащий 5% декстран и 0,1% рибофлавина [5], и по прошествии указанного времени роговицы подвергали процедуре рибофлавин-UVA-индуцированного кросслинкинга для повышения их структурной прочности. Для этого использовался прибор для кросслинкинга роговичного коллагена UV-X™ (IROC, Швейцария) мощностью 3 МВт/см^2 ($5,4 \text{ Дж/см}^2$), длиной волны 365 нм, сфокусированной на 10–12 мм от вершины роговицы. Каждые 5 мин для предотвращения высыхания роговицы на ее поверхность наносился раствор 0,1% рибофлавина. Общее время манипуляции составило 30 минут.

Метод выделения и культивирования фибробластов

Фибробласты выделялись из биоптата кожи взрослого человека с помощью механической дезагрегации и ферментативной обработки 0,1% коллагеназой I типа (Worthington, США) с последующей отмывкой и центрифугированием. Клеточный осадок трижды отмывали в среде DMEM. Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей

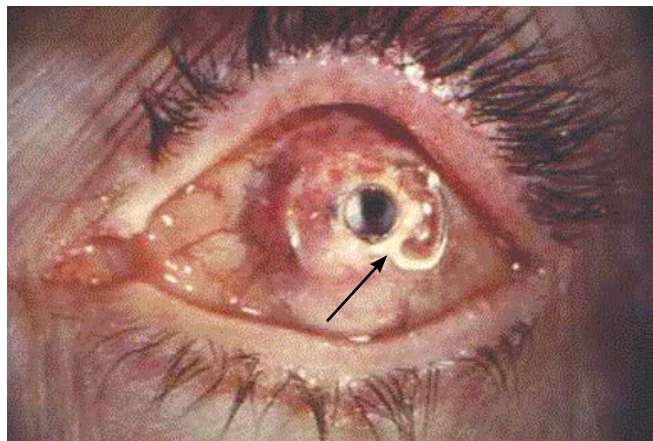


Рис. 1. Фото глаза больного С. при расплавлении передних слоев роговицы над опорной частью кератопротеза. Срок после протезирования – 4 года. Стрелкой указана опорная пластинка кератопротеза

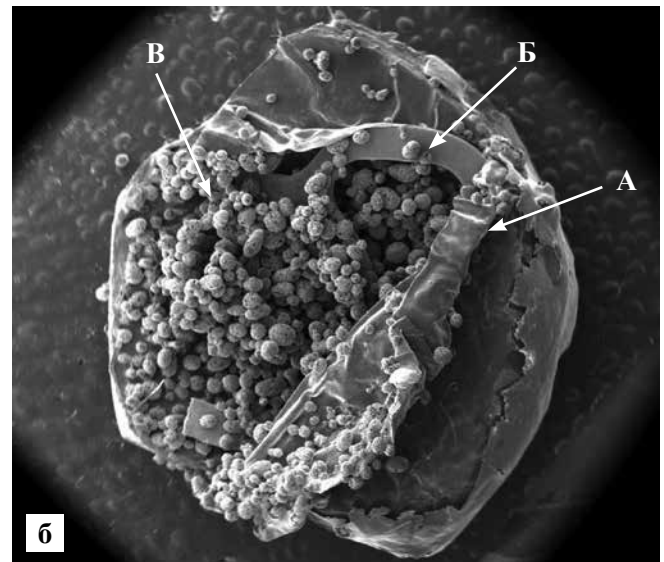
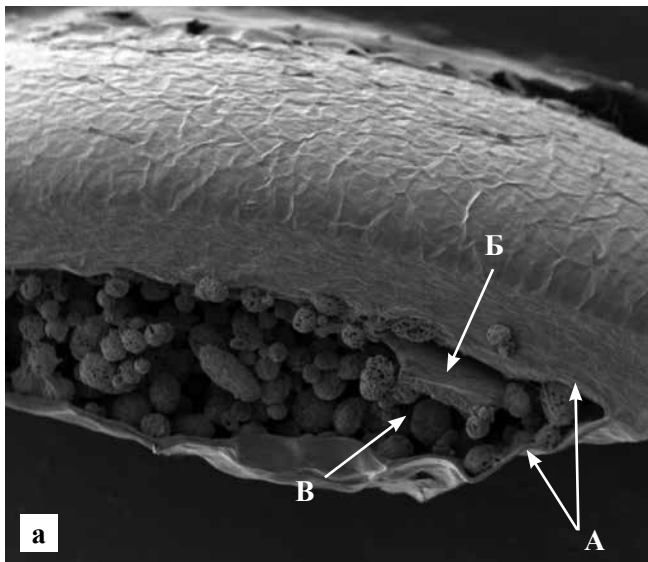


Рис. 2. Фрагмент биокератопротезного комплекса (7-е сутки инкубирования): а – вид сбоку (СЭМ $\times 100$); б – вскрытая внутренняя стенка интрастромального кармана, вид сверху (СЭМ $\times 50$). Стрелками указаны: А – строма роговицы; Б – опорная пластинка кератопротеза; В – коллагеновые микросферы

10% ЭТС. На 3-м пассаже культуры фибробластов трансфицировали геном зеленого флуоресцирующего белка GFP под CMV-промотором при помощи лентивирусной конструкции (ООО «Евроген», Россия) для возможности их прижизненной визуализации с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Olympus IX51 (Olympus, Япония). Часть трансфицированных клеток пассировали на титановый опорный элемент кератопротеза Федорова–Зуева и культивировали в течение 14 суток в среде DMEM, содержащей 10% ЭТС. Другую часть клеток смешивали с коллагеновыми микроносителями CultiSpher-S (Percell, HyClone, США), представляющими собой биodeградируемые коллагеновые сферы диаметром 100–200 мкм с неровной поверхностью, в соотношении 10^6 клеток на 1 мл микроносителей. Культивирование проводилось в течение 7 суток в среде DMEM с 10% ЭТС.

Моделирование конструкции биокератопротезного комплекса

Нами использовался кератопротез модели Федорова–Зуева, состоящий из перфорированной титановой ОПК и оптического элемента. Так как имплантация оптической части протеза проводится через несколько месяцев после пересадки биокератопротезного комплекса и его приживления в глаз, в конструкции применялась только ОПК. В интрастромальный карман кросслинкинг-модифицированной роговицы вводили титановую ОПК Федорова–Зуева. Далее при помощи автоматической пипетки в карман инъецировали 200 мкл суспензии культивированных фибробластов на микроносителях. Полученные конструкции инкубировали в стандартных культуральных условиях: 5% CO_2 , 100% влажность,

37 °С. Наблюдение с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа проводили на 1, 3, 7 и 14-е сутки.

Для исследования методом сканирующей электронной микроскопии полученные конструкции биокератопротезных комплексов (рис. 2) фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина. Исследования проводили на растровом ионно-электронном микроскопе Quanta 200 3D (FEI, Нидерланды).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты культивирования клеток на титановой опорной пластинке кератопротеза показали выраженную адгезию фибробластов на материале с полным заселением его поверхности к 5–7-му дню (рис. 3).

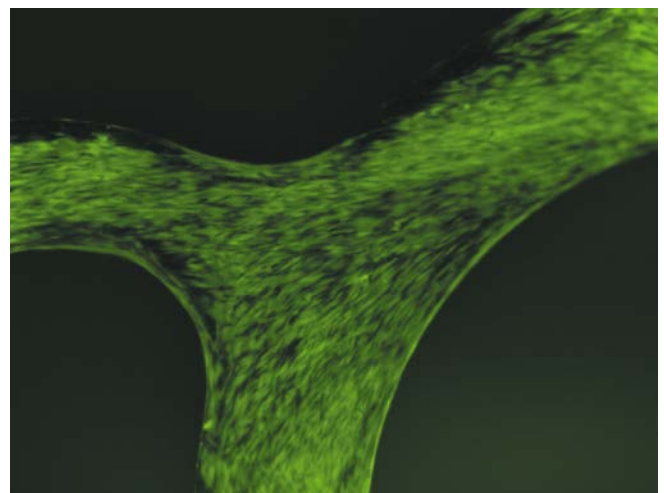


Рис. 3. Монослой трансфицированных фибробластов на опорной титановой пластинке кератопротеза на 5-е сутки. ФЭМ $\times 400$

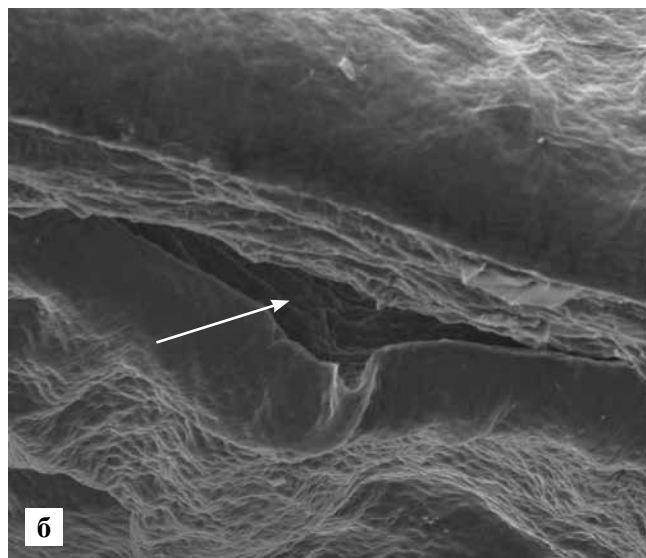
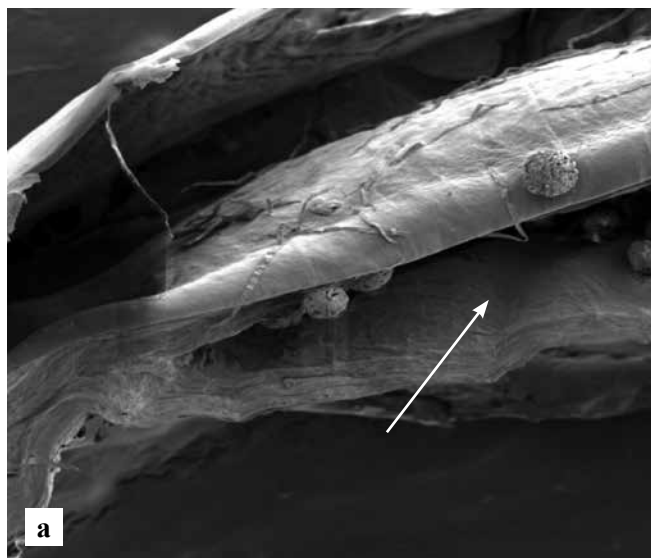


Рис. 4. Коллагеновые пластины стромы (7-е сутки инкубирования): а – кросслинking-модифицированная роговица, в интрастромальный карман которой введены фибробласты на коллагеновых микросферах (СЭМ $\times 60$); б – интактная роговица с выкроенным интрастромальным карманом (СЭМ $\times 300$). Стрелкой указан интрастромальный карман

С помощью инвертированной флуоресцентной микроскопии (ФЭМ) установлено, что фибробласты заселяют всю площадь поверхности коллагеновых микросфер к 5–7-му дню.

Данные сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) показали более плотную упаковку коллагеновых пластин стромы кросслинking-модифицированных роговиц по сравнению с таковой интактных роговиц (рис. 4).

По данным флуоресцентной и сканирующей электронной микроскопий, после введения внутрь кармана фибробласты были жизнеспособными. Клетки активно мигрировали с коллагеновых микронесителей и адгезировались на тканях роговицы (рис. 5). К 5–7-м суткам инкубирования начинали образовываться фибриллы в виде перемычек между

поверхностями микронесителей и стромой роговицы (рис. 6). На этом же сроке наблюдалась биодеградация коллагеновых микросфер и их начальная интеграция в ткани роговицы (рис. 7).

Таким образом, уже через 7 суток инкубирования биоинженерной конструкции биокератопротез может быть имплантирован пациентам с осложненными и истонченными бельмами.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведение процедуры кросслинkingа на аллогенных донорских роговицах, по данным СЭМ, позволило увеличить прочностные свойства коллагеновых волокон стромы, что особенно важно при использовании различного рода протезных конструкций.

Биологическая инертность опорной пластинки из титанового материала подтверждена выраженной адгезией фибробластов, формированием клеточного монослоя и дальнейшей пролиферацией клеток вокруг опорного элемента внутри интрастромального кармана.

Коллагеновые микронесители в качестве 3D-матрикса способствовали малотравматичному введению клеток в интрастромальный карман роговицы и являлись дополнительным субстратом для синтеза межклеточного вещества.

Пролиферация и миграция фибробластов в интрастромальном кармане роговицы способствовала образованию фибриллярного синцития и интеграции коллагена микронесителей в строму роговицы, что, вероятно, свидетельствует о начальном формировании фиброзной ткани вокруг опорного элемента кератопротеза Федорова–Зуева.

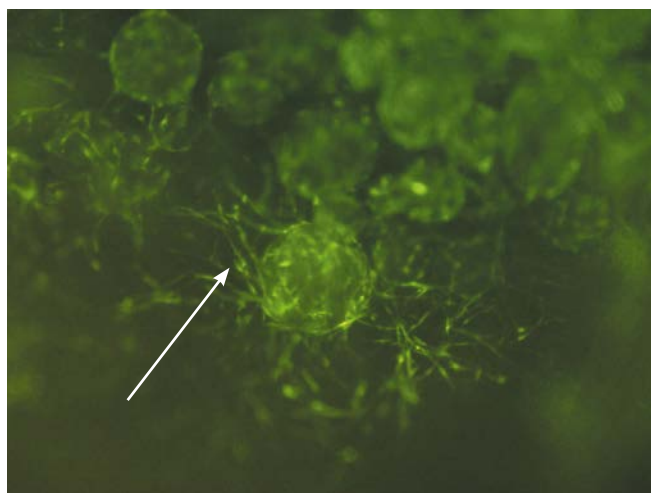


Рис. 5. Миграция фибробластов с поверхности коллагеновых микросфер и их адгезия на тканях роговицы на 7-е сутки инкубирования. ФЭМ $\times 800$

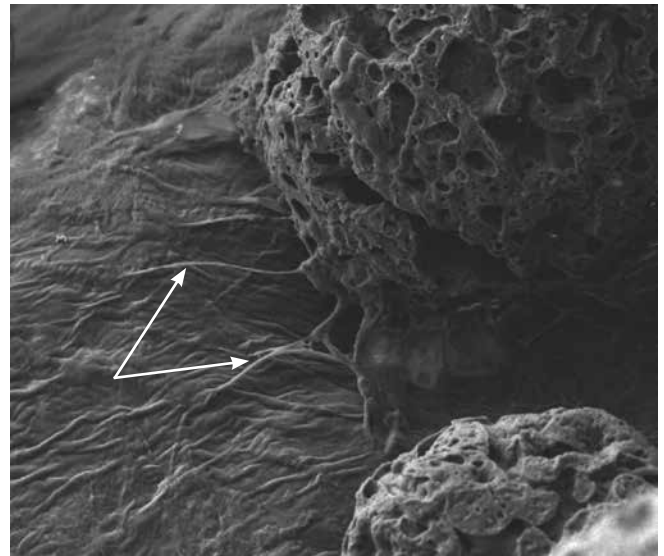
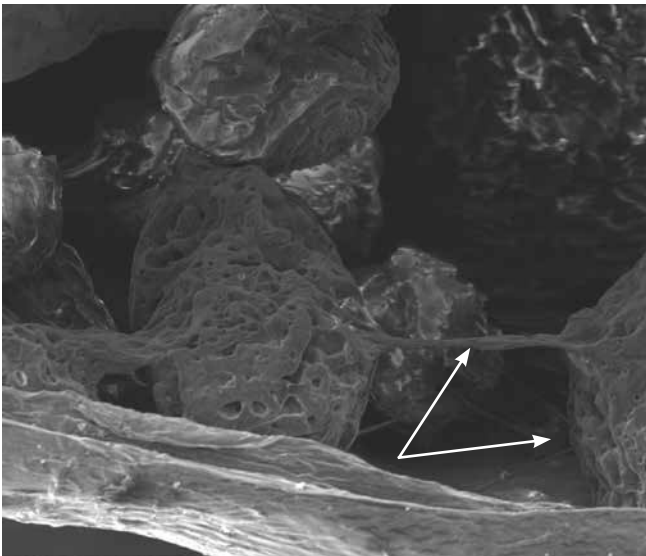


Рис. 6. Образование фибриллярного синцития на 7-е сутки инкубирования. Стрелками указаны «перемычки» между коллагеновыми микросферами и стромой роговицы. СЭМ $\times 1200$

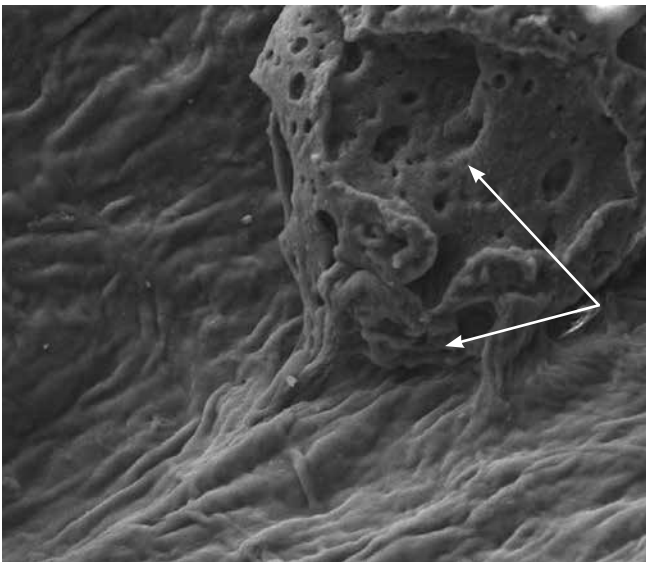


Рис. 7. Начальная интеграция коллагена микроносителей в ткани роговицы на 7-х сутках инкубирования. Стрелками указаны зоны деградации микросферы. СЭМ $\times 2800$

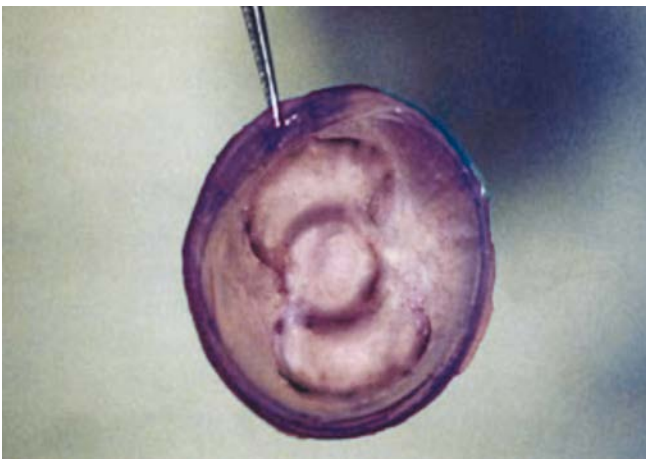


Рис. 8. Сформированный биокератопротезный комплекс

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработанная конструкция биокератопротезного комплекса (рис. 8) обладает рядом преимуществ за счет повышения прочностных свойств «сшитой» стромы роговицы и введения фибробластов на коллагеновых микроносителях, что способствует развитию пролиферативных процессов, направленных на поддержание трофики биокератопротезного комплекса, профилактики кератомалиции и протрузии опорной пластинки.

В рамках проекта Роснауки по договору № 13.G25.31.0080 от 22.10.10 «Создание высокотехнологичного производства продуктов клеточных технологий для регенеративной медицины» (шифр 2010-218-02-172).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васильев А.В., Макаров П.В., Роговая О.С. и др. Восстановление дефектов роговицы с помощью тканевой инженерии // Известия РАН. Серия биол. 2005. Т. 32. С. 5–8.
2. Гундорова Р.А., Малаева Л.В., Удинцов Б.Е. Кератопротезирование // Методическое письмо. М., 1977.
3. Зуев В.К. Сквозное кератопротезирование роговой оболочки при ожоговых бельмах. Дис. ... канд. мед. наук. М., 1974. 122 с.
4. Калинин Ю.Ю. Оптическое биокератопротезирование ожоговых бельм. Дис. ... д-ра мед. наук. М., 2004. 303 с.
5. Мороз З.И., Борзенко С.А., Калинин Ю.Ю. и др. Способ обработки трупной роговицы человека перед кератопластикой. Патент РФ № 2381649.
6. Пальцев М.А. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. Том 1. М.: Медицина. Шико, 2009. 272 с.

7. Пучковская Н.А., Якименко С.А. Оптическое кератопротезирование. Киев: Здоров'я, 1986. 120 с.
8. Роговая О.С., Васильев А.В., Киселев И.В. и др. Использование фибробластов человека, выращенных на микроносителях, для формирования эквивалента соединительной ткани // Онтогенез. 2004. Т. 35. № 2. С. 105–109.
9. Саркисов Д.С., Алексеев А.А., Глуценко Е.В. и др. Теоретические и практические аспекты использования культивированных фибробластов при восстановлении целостности кожного покрова // Вестник РАМН. 1994. Т. 6. С. 6–11.
10. Федоров С.Н., Мороз З.И., Зуев В.К. Кератопротезирование, М.: Медицина, 1982. 144 с.
11. Хенч Л., Джонс Д. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей М.: Техносфера, 2007, 304 с.
12. Шехтер А.Б., Берченко Г.Н. Фибробласты и развитие соединительной ткани: ультраструктурные аспекты биосинтеза, фибриллогенеза и катаболизма коллагена // Архив патологии 1978. Вып. 8. С. 70.
13. Bell E., Rosenberg M. The commercial use of cultivated human cells // Transplantat. Proc., 1990. V. 22 P. 971–974.
14. Chirilia T.V., Constable I.I., Crawford G. et al. Keratoprosthesis // US Patent 5, 300, 116, 5 April 1994.
15. Dohlman C.H., Netland P.A., Fung W.C. Experience with a keratoprosthesis. // Anales del Instituto Barraquer. 1999. Vol. 31. № 2.
16. Horch R.E., Kopp J., Kneser U. et al. Tissue engineering of cultured skin substitutes // J. Cell. Mol. Med. 2005. Vol. 9, № 3. P. 592–608.
17. Spoerl E., Wollensak G., Dittert D et al. Thermomechanical Behavior of Collagen-Cross-Linked Porcine Cornea // Ophthalmologica 2004; Vol. 218; 136–140.
18. Strampelli B. Keratoprosthesis with osteodental tissue // Amer. J. Ophthalmol. 1993. Vol. 89. P. 1029–1039.
19. Yonezawa M., Tanizaki H., Inoguchi N et al. Clinical study with allogenic cultured dermal substitutes for chronic leg ulcers // Int. J. Dermatol. 2007. Vol. 46. № 1. P. 36–42.
20. Wollensak G., Spoerl E., Seiler Th. Stress Strain Measurements of Human and Porcine Corneas after Riboflavin/Ultraviolet-A Induced Crosslinking // J. Cataract Refract. Surg.; Sep. 2003; Vol. 29; 1780–1785.